



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **80829** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**G01N 33/00**  
**A61P 13/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 15016</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Колесник Микола Олексійович (UA),</b> <b>Гайсенюк Федір Зіновьевич (UA),</b> <b>Петрина Олена Петрівна (UA),</b> <b>Дріянська Вікторія Євгенівна (UA),</b> <b>Величко Марина Борисівна (UA),</b> <b>Ліпсунова Людмила Олександрівна (UA),</b> <b>Драннік Георгій Миколайович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>27.12.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.06.2013</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.06.2013, Бюл.№ 11</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ НЕФРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",</b> вул. Дегтярівська, 17-В, м. Київ, 04050 (UA), <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ УРОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ",</b> вул. Ю. Коцюбинського, 9-а, м. Київ, 04053 (UA)

**(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ВИНИКНЕННЯ ЗАХВОРЮВАННЯ НИРОК**

**(57) Реферат:**

Спосіб прогнозування виникнення захворювання нирок включає дослідження HLA-фенотипу за антигенами локусів A і B. Проводять типування лімфоцитів крові і за наявності у дорослих осіб антигенів-провокаторів A10, A11, B14, B16 та B17 прогнозують схильність до розвитку пієлонефриту, а - A23, A24, A28, A29, B8, 38, 44 - хронічного гломерулонефриту з нефротичним синдромом.

UA 80829 U



Корисна модель належить до галузі медицини, а саме до нефрології, і може бути використана для визначення факторів ризику розвитку хвороб нирок, а саме пієлонефриту та хронічного гломерулонефриту з нефротичним синдромом.

Антигенам головного комплексу гістосумісності (HLA), які забезпечують функціональну взаємодію практично всіх імуноткомпетентних клітин, належить важлива роль в підвищенні ризику певних захворювань, і пошук генетичних основ схильності дозволив розкрити деякі механізми, які пояснюють зв'язок системи HLA з захворюваннями, в тому числі через кореляцію між певними генами цього комплексу і станом імунітету. Виявлення таких асоціацій може сприяти розробці методів профілактики і лікування захворювань нирок.

Взаємозв'язок системи HLA з захворюваннями базується як на генетичній детермінованості (зчепленості), так і на генетичній асоціації. В першому випадку "патологічний" і ген має істинне зчеплення з HLA комплексом, тобто локалізується в тій самій хромосомі. Проте, найчастіше зв'язок HLA і захворювань проявляється в формі асоціацій, в цьому випадку говорять лише про схильність до патології. Причому, один ген може мати досить сильний зв'язок з одним захворюванням і слабкий з іншим.

Відомий спосіб прогнозування розвитку патологій (1), що включає виявлення зв'язку HLA-антигенів і ряду захворювань (анкілозуючий спондиліт, синдром Рейтера, синдром Шегрена та ін.), коли використовують показник відносного ризику захворювання RR, який дозволяє визначити ступінь ризику розвитку захворювання у носіїв антигену HLA в порівнянні з індивідами, що не несуть даний антиген. Дослідники передбачають цілий ряд механізмів, за допомогою яких гени, які контролюють імунну відповідь, здатні контролювати схильність або стійкість до захворювання, в тому числі хвороб нирок, за участю як аутоімунних, так і імунodefіцитних причин - наприклад, надто слабка реакція на бактеріальний антиген у нирці з незадовільною його елімінацією сприяє виникненню пієлонефриту.

Недоліком цього способу є те, що він не враховує асоціації з патологією нирок всіх відомих на сьогодні антигенів різних локусів, а саме A і B, в тому числі при порівнянні хворих з інфекційним та аутоімунним походженням захворювань нирок.

Відомий також спосіб визначення частоти HLA-A та B антигенів у хворих на гломерулонефрит (2), взятий нами за прототип, що включає дослідження HLA-фенотипу за антигенами локусів A і B при тестуванні дітей західноєвропейської популяції з хронічним гломерулонефритом та виявлення більшої частоти HLA-B12 в порівнянні з контрольною групою здорових дітей, у яких B12 рецидив захворювання був частішим, ніж в групі без цього антигену.

Недоліком способу є те, що не визначені антигени-провокатори та протектори захворювань нирок для дорослих осіб в українській популяції (в той час як імунотгенетики вважають необхідним визначати асоціації між системою HLA і патологічними станом в рамках популяцій і етнічних груп, частота розподілу антигенів, в яких може суттєво відрізнятися).

В основі корисної моделі поставлена задача вдосконалити спосіб прогнозування виникнення захворювання нирок шляхом типування лімфоцитів крові у дорослих осіб української популяції та за наявності у особи антигенів-провокаторів A10, A11, B14, B16 та B17 прогнозують схильність до розвитку пієлонефриту, а - A23, A24, A28, A29, B8, 38, 44 - хронічного гломерулонефриту з нефротичним синдромом.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб прогнозування виникнення захворювання нирок, що включає дослідження HLA-фенотипу за антигенами локусів A і B, згідно з винаходом, проводять типування лімфоцитів крові і за наявності у дорослих осіб антигенів-провокаторів A10, A11, B14, B16 та B17 прогнозують схильність до розвитку пієлонефриту, а - A23, A24, A28, A29, B8, 38, 44 - хронічного гломерулонефриту з нефротичним синдромом.

Спосіб прогнозування виникнення захворювання нирок (пієлонефриту та/чи гломерулонефриту) виконують наступним чином: HLA-фенотип хворих визначають за методом стандартного лімфоцитотоксичного тесту на планшетах Терасакі з застосуванням спеціальної панелі анти-HLA сироваток.

Лімфоцити периферичної крові вилучають за методом А. Воуіт. Забір крові об'ємом 5-10 мл здійснюють шляхом венепункції у скляні силіконовані пробірки, які містять розчин гепарину, розведеного середовищем 199 у відношенні 1:9, або антикоагулянт ЕДТА. Об'єм венозної крові розводять середовищем 199 у співвідношенні 1:1, м'яко пікетують для одержання однорідної консистенції розчину й акуратно нашаровують на розчин фікол-верографіну ( $\beta=1,077$ ). Увесь об'єм розведеної венозної крові (10-20 мл) нашаровують на фікол-верографін, розлитий у дві центрифужні пробірки об'ємом 4-5 мл. Після центрифугування за швидкості 1500 об/хв на центрифугу ОПН-3 протягом 25 хвилин акуратно відбирають пастерівською піпеткою весь лімфоцитарний шар в інтерфазі та обробляють 0,83 % розчином  $\text{NH}_4\text{Cl}$  протягом 10 хвилин для повного лізису еритроцитів. Одержані лімфоцити відмивають двічі середовищем 199 в об'ємі 8-

10 мл, центрифугуючи 10 хвилин за  $V=1500$  об/хв. Одержаний лімфоцитарний осад розводять 3-5 мл середовища 199. Клітини підраховують у камері Горяєва та доводять до концентрації  $2 \times 10^4$  в 1 мл. HLA-фенотип хворих визначають за стандартним методом лімфоцитотоксичного тесту на планшетах Терасакі із застосуванням спеціальної панелі анти- HLA сироваток. Гістотипуючі сироватки розкачують в лунки планшетів Терасакі під вазелінове масло по 1 мкл та зберігають при  $t=-20$  °C. Лімфоцитарну суміш мікрошприцом закачують у планшетки по 1 мкл в кожен лунку та інкубують при  $t+37$  °C 30 хвилин. Потім у кожен лунку додають по 5 мкл кролячого комплементу та витримують 1 годину при  $t+37$  °C. Після інкубації вазелін витрушують і в кожен лунку закачують по 3 мкл 5 % трипанового синього, через 3 хвилини закачують 5 мкл 40 % формальдегіду та через 15 хвилин під мікроскопом проводять облік інтенсивності цитотоксичної реакції. Антигени локусу HLA-DR визначають у пролонгованому тесті комплементзалежної лімфоцитотоксичності з попереднім збагаченням завису мононуклеарів В-лімфоцитами на колонках з нейлонової вати. Результати реакції трактують шляхом підрахунку % "мертвих" (профарбованих) лімфоцитів в кожній лунці.

Інтерпретація результатів реакції.

0-15 % "мертвих"- негативний результат;

16-20 % - " - слабо позитивний результат (+);

21-50 % - " - позитивний результат (+ +);

51-75 % - " - виражений позитивний результат (+ + +);

76-100 % - " - різко позитивний результат (+ + + +).

Апробація способу, що заявляється, проведена у відділі нефрології та діалізу і лабораторії імунології ДУ "Інститут нефрології НАМН України" та відділі імунології ДУ "Інститут урології НАМН України" у 55 пацієнтів віком від 27 до 48 років з попереднім діагнозом гломерулонефрит, який підтверджений через проведення нефробиопсії.

Проаналізовані фенотипи в групі 45 хворих з підтвердженим діагнозом гломерулонефриту. Якщо в групі здорових (350 осіб) за локусом А у 16 % присутні антигени-провокатори (A23, A24, A28, A29), то в аналізованій групі - у 62 % (у 28 пацієнтів) і різниця достовірна ( $p \leq 0,05$ ). За локусом В такі антигени (B8, 38, 44) у здорових визначені в 14 % випадків порівняно з 51 % (23 пацієнта) у хворих на ГН і різниця достовірна ( $p \leq 0,05$ ).

Частота зустрічальності HLA-A антигенів та критерій відносного ризику (RR) у хворих на пієлонефрит та гломерулонефрит в порівнянні з контрольними групами здорових донорів (K1 та K2) представлені в таблиці 1.

Так, у хворих на пієлонефрит виявлено достовірне підвищення частоти HLA-A10 майже в 2 рази та A11 (35,4 % в порівнянні з 11,4 % у здорових,  $p < 0,05$ ). З гломерулонефритом асоційовані антигени HLA-A23, A24, A28 в порівнянні з 350 здоровими.

При пієлонефриті має місце достовірне зменшення частоти зустрічальності у хворих антигену A2 (20,8 %) при порівнянні з групою здорових донорів (120 осіб), де частота цього антигену складала 56 % ( $p < 0,05$ ), що свідчить про зменшення ризику захворювання при наявності в фенотипі цього антигену.

Таблиця 1

Частота зустрічальності HLA-A антигенів та критерій відносного ризику (RR) у хворих на пієлонефрит (ПН) та гломерулонефрит (ГН) в порівнянні з контрольними групами здорових донорів (K1 та K2)

Антигени	HLA-A					
	Частота в групі %		RR	Частота в групі %		RR
	K1	ПН		K2	ГН	
A2	56,0	20,8*	0,2	49,4	54,8	1,25
A10	13,5	25,0*^	2,1	17,1	13,9	0,8
A11	11,4	35,4*^	4,0	16,3	20,2	1,3
A23	2,1	0	-	2,3	5,3*	2,37
A24	8,5	0	-	6,3	13,5*^	2,31/ $p=0,008$
A28	7,1	4,1	0,6	7,9	13,9*	2,0 $p=0,041$
A29	7,1	4,1	0,6	0,3	1,4*	4,9

\* - різниця з контролем достовірна, ^ - етіологічна фракція.

Частота зустрічальності HLA-B антигенів та критерій відносного ризику (RR) у хворих на пієлонефрит та гломерулонефрит в порівнянні з контрольними групами здорових донорів (K1 та K2) представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Частота зустрічальності HLA-A антигенів та критерій відносного ризику (RR) у хворих на пієлонефрит (ПН) та гломерулонефрит (ГН) в порівнянні з контрольними групами здорових донорів (K1 та K2)

HLA-B						
Антигени	Частота в групі %		RR	Частота в групі %		RR
	K1	ПН		K2	ГН	
B8	10,7	8,3	0,5	13,4	26,9*^	2,38/ p<0,001
B12	20,0	14,5	0,7	20,8	11,5*	0,5 p=0,005
B14	5,0	16,6*^	3,8	7,1	9,1	1,3
B16	5,0	14,5*^	3,2	9,4	2,4*	0,24/ p<0,001
B17	13,5	25,0*	2,1	14,2	9,1	0,6
B21	6,4	2,0*	0,3	5,7	7,7	1,38
B35	22,0	12,5*	0,5	17,1	21,1	1,3
B38				0,8	3,8*	5,1/ 0,038
B40	12,1	6,2*	0,5	10,2	8,1	0,77
B44				0,2	4,3*	15,04/ p=0,002

\* - різниця з контролем достовірна, ^ - етіологічна фракція.

5

По локусу В відмічено достовірне підвищення частоти зустрічальності при пієлонефриті антигенів B14 та B16-16,6 % та 14,4 % у порівнянні з 5 % у здорових; а при гломерулонефриті - B8, 38, 44. Достовірно більш рідко у хворих на пієлонефрит виявляють наступні HLA-антигени: B21, B35 та B40 (p<0,05), а у пацієнтів з хронічним гломерулонефритом - B12 та B16.

10

Таким чином, антигени-провокатори пієлонефриту - A10, A11, B14, B16 та B17, протектори - A2, B21, B35, B40. Для гломерулонефриту такими, що несуть ризик захворювання та хронічного перебігу, є інші антигени - A23, A24, A28, A29, B8, 38, 44, протектори - B12 та B16.

Наводимо приклади практичного застосування запропонованого способу.

Приклад 1

15

Хворий З., 55 років, карта № 3 113, з наявністю клініко-лабораторних ознак гломерулонефриту. Проведено типування лімфоцитів периферичної крові пацієнта за запропонованим способом, яке виявило наявність в фенотипі - A3, A24, B8, B14 - двох антигенів провокаторів (A24 і B8); при обстеженні діагноз "Гломерулонефрит" був підтверджений даними нефробіопсії (морфологічна форма "Фокально-сегментарний гломерулосклероз").

20

Приклад 2

Хворий Зг., 28 років, карта № 3 115, з наявністю клініко-лабораторних ознак гломерулонефриту. Проведено типування лімфоцитів периферичної крові пацієнта за запропонованим способом, яке виявило наявність в фенотипі - A1, A28, B15, B38 - двох антигенів провокаторів (A28 і B38); при обстеженні діагноз "Гломерулонефрит" був підтверджений даними нефробіопсії (морфологічна форма "Фокально-сегментарний гломерулосклероз").

25

Приклад 3

Хворий П., 53 роки, карта № П 346, з наявністю клініко-лабораторних ознак гломерулонефриту. Проведено типування лімфоцитів периферичної крові пацієнта за запропонованим способом, яке виявило наявність в фенотипі - A23, A32, B38, B44 - двох антигенів провокаторів (A23 і B38); при обстеженні діагноз "Гломерулонефрит" був підтверджений даними нефробіопсії (морфологічна форма "Мембранозний гломерулонефрит").

30

Таким чином, застосування способу прогнозування виникнення захворювання нирок дає можливість встановити асоціації між захворюваннями нирок і антигенами HLA, дозволяє виявляти групи підвищеного ризику та використовувати можливі превентивні терапевтичні заходи, а також більш активну терапію при виникненні захворювання для запобігання хронізації та втрати функції нирками.

35

Джерела інформації:

1. Зарецкая Ю.М. Клическая иммуногенетика/ Ю.М. Зарецкая. - М.: Медицина, 1983.-208 с.
2. Thomson P. D. H1A antigens and atopic features in steroid responsive nephrotic syndrome of childhood/ P.D. Thomson [et al.]/ Lancet.-1976.-2. - P. 765-768.

5

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування виникнення захворювання нирок, що включає дослідження HLA-фенотипу за антигенами локусів A і B, який **відрізняється** тим, що проводять типування лімфоцитів крові і за наявності у дорослих осіб антигенів-провокаторів A10, A11, B14, B16 та B17 прогнозують схильність до розвитку пієлонефриту, а - A23, A24, A28, A29, B8, 38, 44 - хронічного гломерулонефриту з нефротичним синдромом.

10

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601